

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюро



(43) Дата международной публикации:
14 июня 2001 (14.06.2001)

РСТ

(10) Номер международной публикации:
WO 01/42443 A1

(51) Международная патентная классификация¹: C12N
15/00, 15/63 // A01N 48/00

[RU/RU]; 117418 Москва, ул. Цюрупы, д. 7, корп.
2, кв. 55 (RU) [CHURIKOV, Nikolai Andreevich,
Moscow (RU)].

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU00/00504

(22) Дата международной подачи:
7 декабря 2000 (07.12.2000)

(74) Агент: ВЫСОЦКАЯ Нина Николаевна, ООО
«СОЮЗПАТЕНТ»; 103735 Москва, ул. Ильинка,
д. 5/2 (RU) [VYSOTSKAYA, Nina Nikolaevna,
Moscow (RU)].

(25) Язык подачи: русский

(26) Язык публикации: русский

(81) Указанные государства (национально): JP, US.

(30) Данные о приоритете:
99125827 9 декабря 1999 (09.12.1999) RU

(84) Указанные государства (регионально): европей-
ский патент (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме
(US): ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛО-
ГИИ ИМ. В.А.ЭНГЕЛЬГАРДА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК [RU/RU]; 117984 Москва, ул.
Вавилова, д. 32 (RU) [INSTITUT MOLEKULAR-
NOI BIOLOGII IM. V.A. ENGELGARDTA ROS-
SIJSKOI AKADEMII NAUK, Moscow (RU)].

Опубликована
С отчётом о международном поиске.

(71) Заявитель и

(72) Изобретатель: ЧУРИКОВ Николай Андреевич

В отношении двухбуквенных кодов, кодов языков и дру-
гих сокращений см. «Пояснения к кодам и сокращениям»,
публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюл-
летеня РСТ.

(54) Title: METHOD FOR MODIFYING GENETIC CHARACTERISTICS OF AN ORGANISM

(54) Название изобретения: СПОСОБ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОРГАНИЗМА

(57) Abstract: The invention relates to the field of molecular biology, molecular genetics, and biotechnology and can be used for purposes of genotherapy as well as in agriculture, industrial biotechnology for gene specific silencing of genes whose expression promotes the development of different diseases and infringes upon a process for producing a required product. The invention proposes a method for modifying the genetic characteristics of organisms by means of RNA interference resulting in the gene-specific silencing of the selected gene with the aid of RNA molecules. The molecules are synthesised *in vitro* using the RNA molecules which are complementary in a parallel direction with (pcRNA) mRNA of the selected gene which are synthesised *in vivo* or *in vitro* on an artificial sequences of DNA which possesses a mirror-symmetrical sequence of nucleotides in respect to the sequence of the gene nucleotides. The invention provides a general approach to the modification of the genetic characteristics of an organism based on the biological characteristics of mirror-inverses of the nucleotide sequences being achieved through RNA-interference which brings about gene-specific silencing.

[Продолжение на след. странице]



US 20020137210A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication**
Churikov(10) Pub. No.: **US 2002/0137210 A1**(43) Pub. Date: **Sep. 26, 2002**(54) **METHOD FOR MODIFYING GENETIC
CHARACTERISTICS OF AN ORGANISM**(76) Inventor: **Nikolai Andreevich Churikov,**
Moscow (RU)

Correspondence Address:

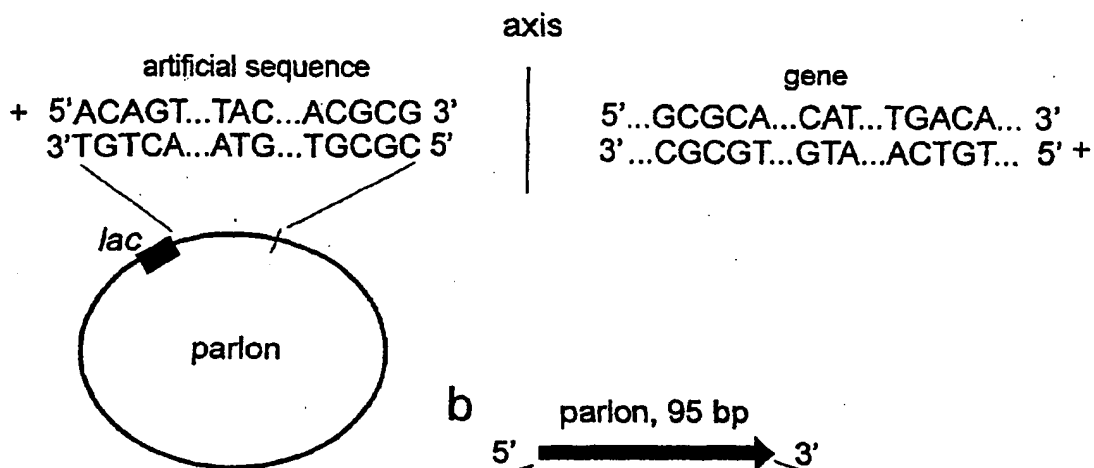
BURNS DOANE SWECKER & MATHIS L L P
POST OFFICE BOX 1404
ALEXANDRIA, VA 22313-1404 (US)(21) Appl. No.: **09/913,040**(22) PCT Filed: **Dec. 7, 2000**(86) PCT No.: **PCT/RU00/00504**(30) **Foreign Application Priority Data****Dec. 9, 1999 (RU) 99125827****Publication Classification**(51) Int. Cl.⁷ **A61K 48/00; C12N 15/87**(52) U.S. Cl. **435/455; 514/44**(57) **ABSTRACT**

The invention concerns with the molecular biology, molecular genetics and biotechnology and can be used in the gene-therapy in the medicine and the agriculture or in the industrial biotechnology for a gene-specific silencing of the disease-related genes or the genes interfering a buildup of a product, respectively.

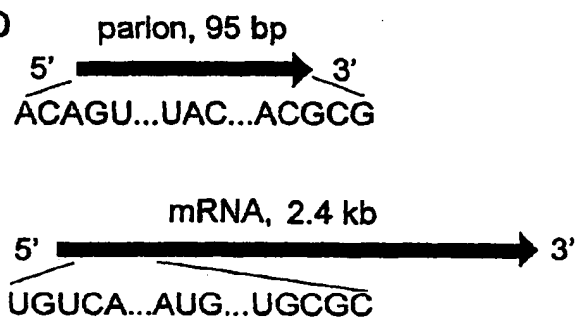
The approach is suggested for changing of genetic properties of an organism by RNA interference leading to gene-specific silencing of a selected gene by RNA molecules, that are complementary in a parallel orientation (pcRNA) to mRNA of the selected gene; pcRNA are synthesized in vivo or in vitro on the artificial DNA sequence possessing symmetrical nucleotide ordering (mirror inversion) in respect to the nucleotide sequence of the gene.

The invention suggests the general approach for changing of genetic properties of an organism and is based on the biological properties of mirror inversions of nucleotide sequences that are realized in RNA interference and gene-specific silencing.

a



b



c

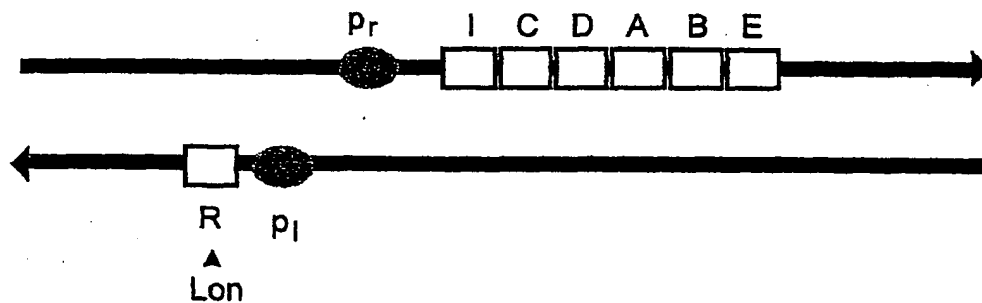


Fig. 1

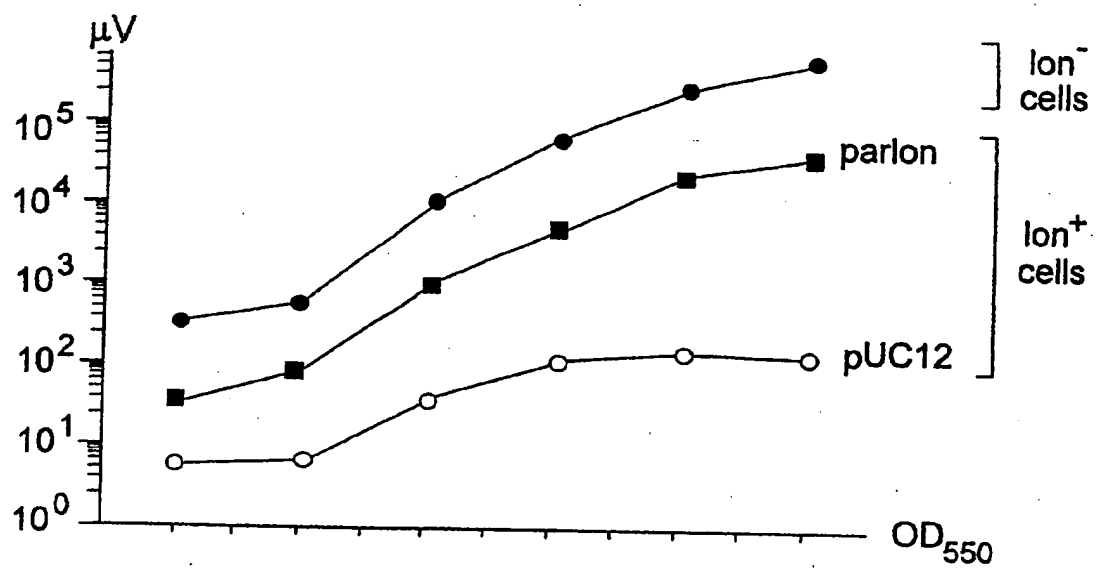


Fig. 2

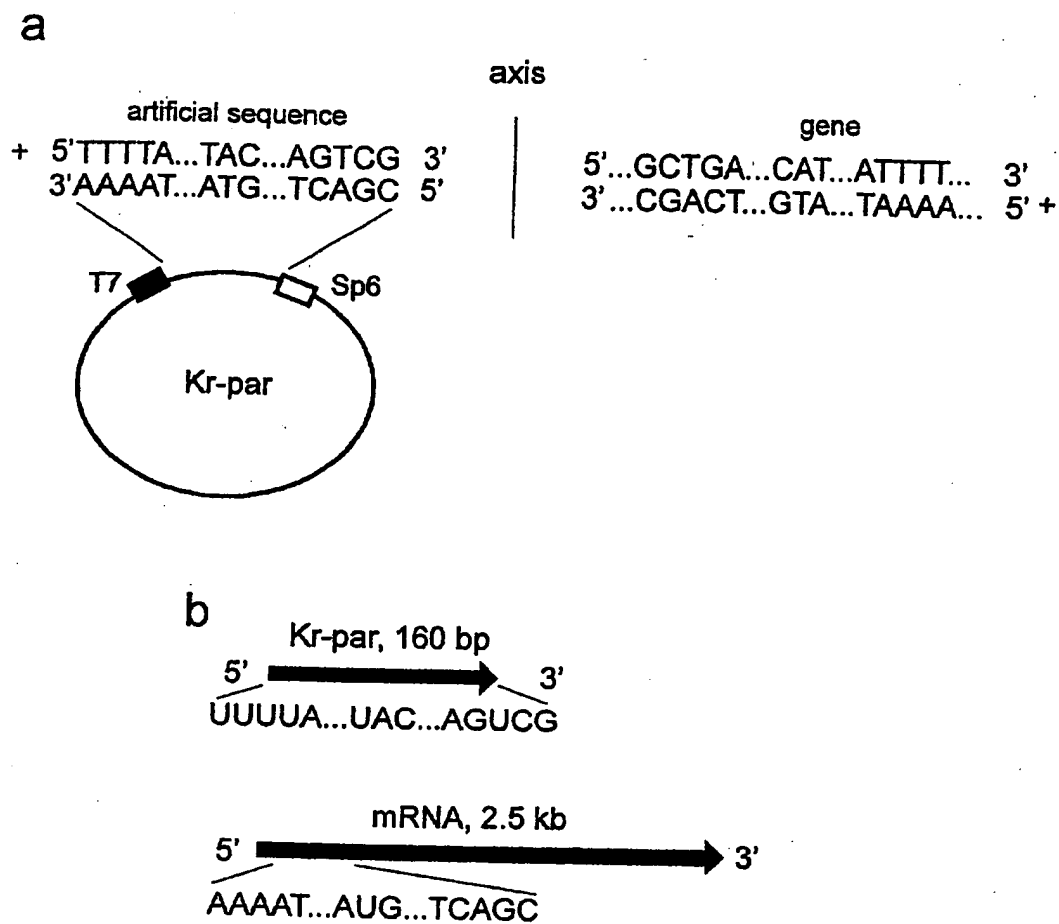
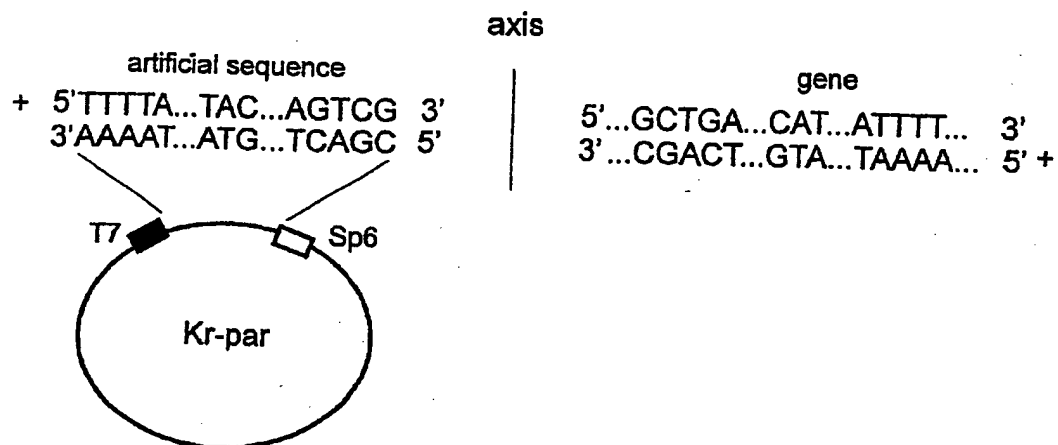


Fig. 3

a



b

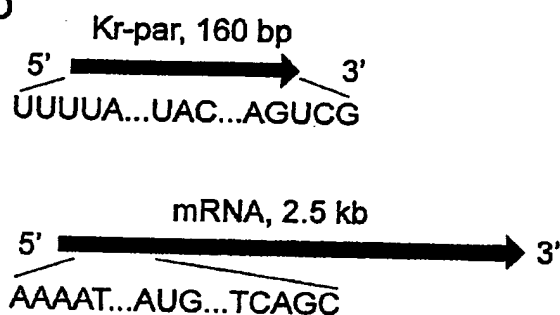


Fig. 3

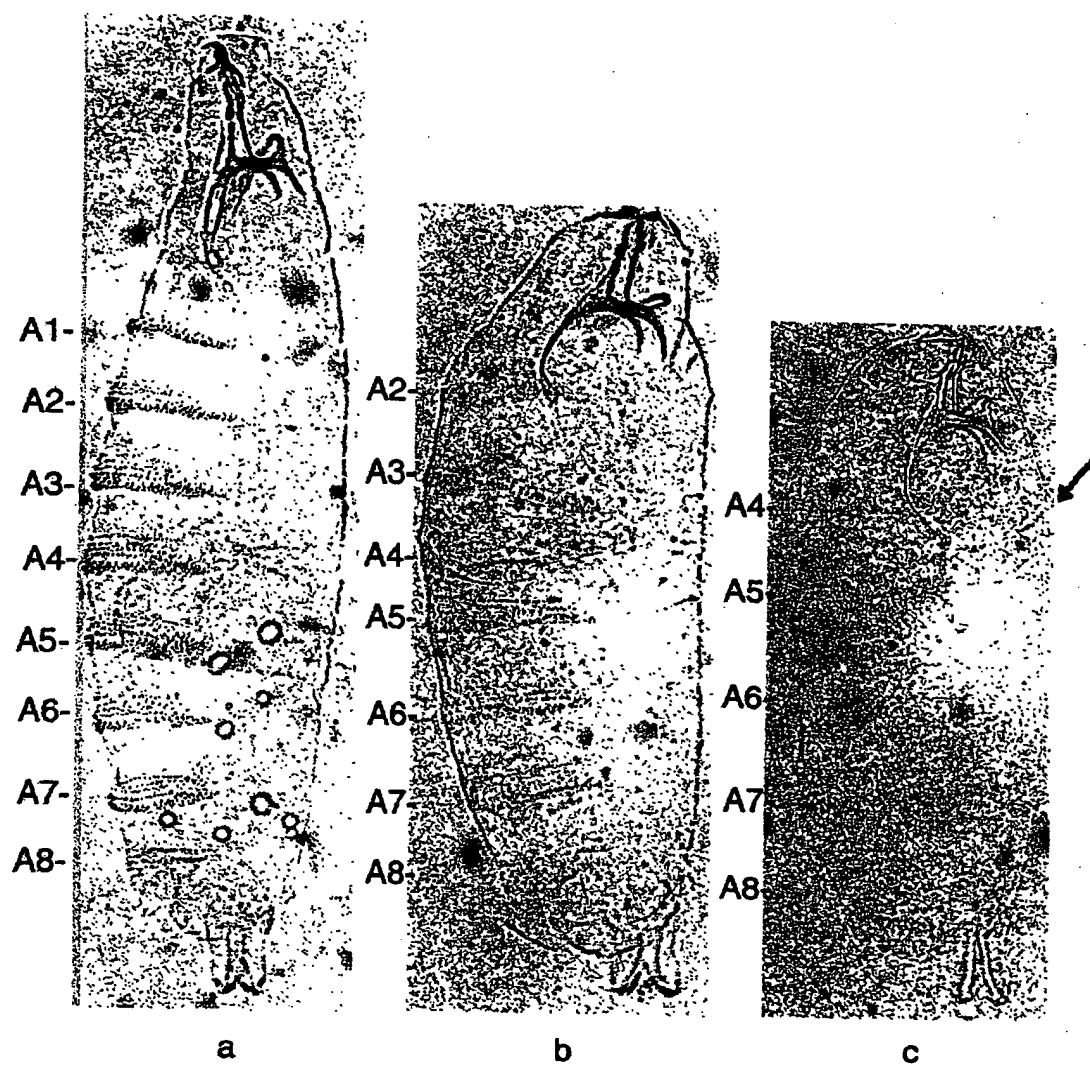


Fig. 4

METHOD FOR MODIFYING GENETIC CHARACTERISTICS OF AN ORGANISM

FIELD OF INVENTION

[0001] The invention concerns with the molecular biology, molecular genetics and biotechnology and can be used in the gene-therapy in the medicine and the agriculture or in the industrial biotechnology for a gene-specific silencing of the disease-related genes or the genes interfering a buildup of a product, respectively.

BACKGROUND OF INVENTION

[0002] Different approaches for changing the genetic properties of an organism are used. Some of them assume the damage of a gene. The example of the latter is so-called genes' knockout. The approach utilizes the damage (mutation) of a selected gene in germ-line or stem cells and thus cannot be used in the most cases for the developed organism [L. V. Varga, S. Toth, I. Novak, A. Falus, Immunol. Lett., 1999, vol. 69, p. 217; J. Osada, N. Maeda, Methods Mol. Biol., 1998, vol. 110, p. 79].

[0003] During recent years an increased attention is attracted by another approach for changing the genetic properties of an organism by RNA interference, leading to a gene-specific silencing by changes of the regulation of an undamaged gene [M. K. Montgomery, A. Fire, Trends in Genetics, 1998, vol.14, p. 255; P. Sharp, Genes & Development, 1999, vol.13, p. 139]. RNA interference can be used for gene-specific silencing at any stage of development, including the adults. The increased attention to RNA interference is due to the fact that these studies serendipitously uncovered the ancient mechanisms of gene regulation. The physiological role of this mechanism of regulation could include the local changes of chromosomal structures, transcription activity, RNA processing and transport into the cytoplasm and RNA stability.

[0004] Up-to-now RNA interference leading to gene-specific silencing was described in different organisms—nematode, *Drosophila*, fungi, plants.

[0005] The known approach for changes of genetic properties of an organism, that is based on RNA interference, uses the antisense RNA (asRNA) that is complementary to the mRNA of the selected gene in antiparallel orientation and is synthesized in vitro and introduced into organism [A. Fire, S.-Q. Xu, M. K. Montgomery, S. V. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, Nature, 1998, vol. 391, p. 806].

[0006] The described approach is carried out as follows:

[0007] 1. A gene with pathogenic activity is selected;

[0008] 2. A DNA construct possessing a selected gene or its cDNA (a sequence corresponding to mRNA), i.e. natural DNA, in the opposite polarity under the control of selected promoter is prepared. This permits to perform transcription of non-coding strand of the gene. For the generation of the construct different vectors are used possessing DNA sequences for selection of transformants, for efficient expression of the turned-over gene and for correct "inscribing" of the construct into chromosomal domains;

[0009] 3. asRNA is synthesized in vitro on the construct and introduced into organism by different methods (electroporation, injections, per os).

[0010] An important problem of this approach for changing of genetic properties of an organism by RNA interference is the often occurrence of reversions of the constructs designed for asRNA synthesis by rearrangements leading to stop of asRNA transcription and start of transcription of the sequences corresponding to mRNA-strand. Thus, instead of inhibition of activity of the selected gene an increased transcription of the gene could occur. Start of transcription of the sequences corresponding to mRNA-strand can also happen if in the target site of insertion of the construct the host promoter sequences transcribing the sense strand are present. The probability of such events is rather high.

[0011] The highness of reversions is illustrated by demonstrative experiments on transgenic organisms. The constructs in these cases were introduced with the opposite aim—to increase the activity of a selected gene. However, reversions by spontaneous activation of transcription from the opposite strand resulted in complete inhibition of gene activity instead of activation of its expression, i.e. to gene-specific silencing by RNA interference mechanisms [M. K. Montgomery, A. Fire, Trends in Genetics, 1998, vol.14, p. 255; P. Sharp, Genes & Development, 1999, vol.13, p.139].

DISCLOSURE OF THE INVENTION

[0012] The approach is suggested for changing of genetic properties of an organism by RNA interference leading to gene-specific silencing of a selected gene by RNA molecules, that are complementary in a parallel orientation (pcRNA) to mRNA of the selected gene; pcRNA are synthesized in vivo or in vitro on the artificial DNA sequence possessing symmetrical nucleotide ordering (mirror inversion) in respect to the nucleotide sequence of the gene.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0013] FIG. 1 shows the structure of the DNA construct possessing mirror nucleotide sequence in respect the *E. coli* lon gene and designed for expression of pcRNA, where:

[0014] a—relationship between nucleotide sequence of the lon gene and the artificial chemically synthesized DNA possessing mirror nucleotide sequence in respect the gene (+ strands correspond to parlon pcRNA or mRNA); the synthesized DNA in the construct is under the control of the lac promoter driving the expression of parlon pcRNA;

[0015] b—relationship between lon mRNA and parlon pcRNA;

[0016] c—genes in the lux-regulon: pr and pl promoters of the lux-regulon are in different strands, genes are shown by the open bars; Lon protease cleaves the gene R product, that activates pr, and thus switches out the genes involved in the luminescence.

[0017] FIG. 2 shows the luminescence of *E. coli* cells that was observed after silencing of the lon gene induced by expression of parlon pcRNA, where:

[0018] lux-regulon from *Vibrio fischeri* was introduced into lon⁺ or lon⁻ *E. coli* cells. In the resulted lon⁺ cells either the construct prepared in the pUC12 vector expressing parlon pcRNA or original pUC12 vectors without any insertion were introduced. The dependence of luminescence of the cells suspension

presented as luminometer data in μV from optical density (OD_{550}). Silencing of the *lon* gene induces the luminescence of the transformants expressing parlon construct.

[0019] FIG. 3 shows the structure of the DNA construct possessing mirror nucleotide sequence in respect the *Drosophila* Kruppel gene and designed for expression of pcRNA (Kr-par), where:

[0020] a—relationship between nucleotide sequence of the Kruppel gene and the artificial chemically synthesized DNA, possessing mirror nucleotide sequence in respect the gene (+ strands correspond to Kr-par pcRNA or mRNA); the synthesized DNA in the construct is under the control of the T7 RNA polymerase promoter driving the expression of Kr-par pcRNA (synthesis on the opposite strand of the construct is driven by SP6 RNA polymerase promoter);

[0021] b—relationship between Kruppel mRNA and Kr-par pcRNA.

[0022] FIG. 4. shows the phenotypes of normal larva and Kr phenocopies generated after injections of the Kr-par pcRNA, where:

[0023] a—phenotypes of normal *Drosophila* larva;

[0024] b—phenotype of the larva developed after injection of the Kr-par pcRNA and possessing deletions of adjacent thoracic and the first abdominal segments;

[0025] c—phenotype of the larva developed after injection of the Kr-par pcRNA and possessing deletions of adjacent thoracic and three anterior abdominal segments.

[0026] Arrow shows the atopic tracheal ending that is characteristic only for Kr phenotype.

BEST MODE OF CARRYING OUT THE INVENTION

[0027] The basis of the suggested invention was to increase the RNA interference reliability and to exclude the possibility of reversions leading to the synthesis of mRNA sequences on a construct designed for gene-specific silencing.

[0028] The approach is suggested for changing of genetic properties of an organism by RNA interference leading to gene-specific silencing of a selected gene by RNA molecules that are complementary in a parallel orientation (pcRNA) to mRNA of the selected gene; pcRNA are synthesized in vivo or in vitro on the artificial DNA sequence possessing symmetrical nucleotide ordering (mirror inversion) in respect to the nucleotide sequence of the gene.

[0029] This approach leads to more efficient RNA interference and gene-specific silencing and excludes the synthesis of mRNA sequences because in the constructs the non-homologous artificial DNA sequence is used.

[0030] The suggested approach is carried out as follows:

[0031] 1. A gene with pathogenic activity (leading to a disease or interfering a buildup of biotechnological product) is selected;

[0032] 2. Artificial DNA sequence is chemically synthesized, possessing the mirror nucleotide ordering in respect to the selected gene or its fragment;

[0033] 3. A DNA construct is prepared on the basis of different vectors, possessing the chemically synthesized DNA sequence under the control of appropriate promoter, and a number of sequences important for efficient expression of the insert, and for correct "inscribing" of the construct in chromosomal domains;

[0034] 4. The construct is introduced into organism by different methods for in vivo synthesis of pcRNA (transformation), or pcRNA is synthesized in vitro and used for injections.

[0035] The invention is clarified by the examples describing the realization of the suggested approach for changing of genetic properties of organisms (in which the changes of phenotype are observed) and illustrated by 4 figures.

THE DATA SUPPORTING THE FEASIBILITY OF THE INVENTION

[0036] The following examples are preferable and aimed only to confirm the feasibility of the invention and cannot be used as an argument for the restriction of the capacity of the Inventor's claims. Expert in the field will find easily another applications for the invention, which are undoubtedly covered by the Inventor's claims stated in the Claim listed below.

EXAMPLE 1

RNA Interference in *Escherichia coli* Induced by in vivo Synthesized RNA Molecules that are Complementary in the Same Polarity to mRNA of the *lon* Gene

[0037] The *lon* gene was selected as far as it plays a key role in different regulatory events in *E. coli* cells.

[0038] Artificial DNA 95-bp (bp—base pair in DNA or RNA) sequence possessing the mirror nucleotide ordering in respect to the region of the *lon* gene was chemically synthesized.

[0039] This DNA was used for the pUC12-construct in which the strand expressing the parlon pcRNA is under the control of the lac promoter (FIGS. 1a, b).

[0040] The construct was introduced into *E. coli* cells by transformation.

[0041] The impact of parlon pcRNA expression on the activity of the endogenous *lon* gene was measured by effect of the latter on the activity of the lux-regulon that was introduced into *E. coli* cells from *Vibrio fischeri*. *Lon* protease is a negative regulator of the lux-regulon because it specifically cleaves the LuxR protein. The latter forms the complex with autoinductor and finally activates expression of the proteins involved in the luminescence. Promoters pr and pl of the lux-regulon are located in different strands, genes involved in the luminescence are shown by the open bars (FIG. 1c). Actively expressing *lon* gene inhibits the transcription in the lux-regulon, that phenotypically is observed as inhibition of the luminescence. In contrast, silencing of the *lon* gene leads to increase of the LuxR concentration and to activation of the transcription in the

lux-regulon and, consequently, to considerable enhancement of the luminescence of the cells. Lux-regulon, as 16 kb BamHI DNA fragment from *Vibrio fischeri*, was introduced into lon⁺ cells *E. coli* K12 AB1157 or lon⁺ cells *E. coli* K12 AB1899 (lonl).

[0042] The resulted lon⁺ cells are transformed either by the pUC12-construct expressing parlon pcRNA, or by pUC12 vector without any insert. Silencing of the lon gene is measured by enhancement of the luminescence of the cells. The luminescence of the cells expressing the parlon pcRNA is increased in several orders of the magnitude in comparison with the control pUC12-containing cells (FIG. 2).

[0043] The parlon pcRNA expressing transformants grown on plates reveal the characteristic property of the lon⁻ phenotype or for the silenced lon gene and form rather mucous colonies.

EXAMPLE 2

Generation of Kruppel (Kr) Phenocopies by Injections into Drosophila Embryos of in vitro Synthesized RNA, that is Complementary in the Same Polarity to mRNA

[0044] Kr is a homeotic gene, that is active in zygote and controls segment formation at the early embryonic stage of Drosophila development, was selected as a model allowing one to observe the early development in a multicellular organism. Kr mutants have deletions of the adjacent thoracic and anterior abdominal segments. Phenotypically this is observed just after cuticula formation and hatching of the larvae. Kr mutants have deletions of the adjacent thoracic and from one to several anterior abdominal segments and, sometimes, the development of actopic tracheal ending in the anterior part of the larva [E. Weischaus, C. Nusslein-Volhard, H. Kluding, Development, 1984, vol. 104, p. 172]. Thereafter, the Kr mutants have a unique phenotype developed as early as one day, that gives an advantage for study of the effect of RNA on a phenotype. Additional argument in favor of this model was that the study by antisense RNA injections was performed earlier [U. B. Rosenberg, A. Preiss, E. Seifert, H. Jackle, D. C. Knippe, Nature, 1985, vol. 313, p. 703].

[0045] Artificial DNA 160-bp sequence possessing the mirror nucleotide ordering in respect to the region of the Kr gene was chemically synthesized (FIGS. 3a, b). It should be stressed that antisense RNAs are synthesized on the non-coding strand of the same gene, while pcRNA can be synthesized only on the heterologous artificial DNA possessing the mirror order of nucleotide sequence.

[0046] The chemically synthesized artificial DNA is used for the construct in the pGEM-1 vector allowing to perform pcRNA synthesis with T7 RNA polymerase. pcRNA was denoted as Kr-par because it is complementary in a parallel orientation to Kr mRNA.

[0047] Embryos of the Oregon RC line are injected with pcRNA samples in the posterior pole at the syncytial stage

and incubated under the water at 25° C. for 18-24 h. Then cuticula mounts are prepared and studied under the phase-contrast microscope.

[0048] The development of the larvae possessing typical Kr phenotype were observed. In control experiments, after injections of RNA synthesized on the opposite strand of the same construct with SP6 RNA polymerase, the development of normal larvae were observed.

[0049] FIG. 4 shows the normal larva (a) and two larvae developed after injections of Kr-par preparation (b, c). The latter have deletions of the thoracic and one or three abdominal segments and actopic tracheal ending in the anterior part of the larva, that is typical for Kr phenotype. The frequencies of observed phenocopies are about the same value as after injections with asRNA [U. B. Rosenberg, A. Preiss, E. Seifert, H. Jackle, D. C. Knippe, Nature, 1985, vol. 313, p. 703]. This demonstrates that pcRNA effects the expression of a key gene for differentiation in a multicellular organism, and a directed change of genetical properties of organism is attained.

[0050] Thus, the effect of nucleic acids possessing mirror inversions of nucleotide sequences and introduced by different ways in an organism on the phenotype is revealed. The main advantage of the suggested approach is that mirror sequences are capable of pcRNA synthesis and RNA interference but being heterologous cannot specify the corresponding mRNA sequence. That is why the utilization of this approach ("palindromic" approach), in contrast to regular approach using asRNA ("antisense" approach), cannot lead to reversion and to synthesis of the mRNA sequence.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

[0051] The invention suggested the general approach for changing of genetic properties of an organism and is based on the biological properties of mirror inversions of nucleotide sequences that are realized in RNA interference and gene-specific silencing. The suggested approach is based on the potent and specific biological activity of the transcripts coming from mirror inversions of nucleotide sequences in DNA, leads to changes in phenotype, and can be used in the gene-therapy in the medicine and the agriculture or in the industrial biotechnology for a gene-specific silencing of the disease-related genes or the genes interfering a buildup of a product, respectively.

1. The approach for changing of genetic properties of an organism by RNA interference leading to gene-specific silencing of a selected gene by RNA molecules, that are synthesized in vitro, differing by usage of RNA molecules that are complementary in a parallel orientation (pcRNA) to mRNA of the selected gene; pcRNA are synthesized in vivo or in vitro on the artificial DNA sequence possessing symmetrical nucleotide ordering (mirror inversion) in respect to the nucleotide sequence of the gene.

* * * * *

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюро



(43) Дата международной публикации:
14 июня 2001 (14.06.2001)

РСТ

(10) Номер международной публикации:
WO 01/42443 A1

(51) Международная патентная классификация¹: C12N
15/00, 15/63 // A01N 48/00

[RU/RU]; 117418 Москва, ул. Цорупы, д. 7, корп.
2, кв. 55 (RU) [CHURIKOV, Nikolai Andreevich,
Moscow (RU)].

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU00/00504

(22) Дата международной подачи:
7 декабря 2000 (07.12.2000)

(74) Агент: ВЫСОЦКАЯ Нина Николаевна, ООО
«СОЮЗПАТЕНТ»; 103735 Москва, ул. Ильинка,
д. 5/2 (RU) [VYSOTSKAYA, Nina Nikolaevna,
Moscow (RU)].

(25) Язык подачи: русский

(81) Указанные государства (национально): JP, US.

(26) Язык публикации: русский

(30) Данные о приоритете:
99125827 9 декабря 1999 (09.12.1999) RU

(84) Указанные государства (регионально): европей-
ский патент (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме
(US): ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛО-
ГИИ ИМ. В.А.ЭНГЕЛЬГАРДА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК [RU/RU]; 117984 Москва, ул.
Вавилова, д. 32 (RU) [INSTITUT MOLEKULAR-
NOI BIOLOGII IM. V.A. ENGELGARDTA ROS-
SIJSKOI AKADEMII NAUK, Moscow (RU)].

Опубликована
С отчетом о международном поиске.

(71) Заявитель и
(72) Изобретатель: ЧУРИКОВ Николай Андреевич

В отношении двухбуквенных кодов, кодов языков и дру-
гих сокращений см. «Пояснения к кодам и сокращениям»,
публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюл-
летеня РСТ.



(54) Title: METHOD FOR MODIFYING GENETIC CHARACTERISTICS OF AN ORGANISM

(54) Название изобретения: СПОСОБ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОРГАНИЗМА

(57) Abstract: The invention relates to the field of molecular biology, molecular genetics, and biotechnology and can be used for purposes of gene therapy as well as in agriculture, industrial biotechnology for gene specific silencing of genes whose expression promotes the development of different diseases and infringes upon a process for producing a required product. The invention proposes a method for modifying the genetic characteristics of organisms by means of RNA interference resulting in the gene-specific silencing of the selected gene with the aid of RNA molecules. The molecules are synthesised *in vitro* using the RNA molecules which are complementary in a parallel direction with (pcRNA) mRNA of the selected gene which are synthesised *in vivo* or *in vitro* on an artificial sequences of DNA which possesses a mirror-symmetrical sequence of nucleotides in respect to the sequence of the gene nucleotides. The invention provides a general approach to the modification of the genetic characteristics of an organism based on the biological characteristics of mirror-inverses of the nucleotide sequences being achieved through RNA-interference which brings about gene-specific silencing.

[Продолжение на след. странице]

WO 01/42443 A1



(57) Реферат:

Изобретение относится к области молекулярной биологии, молекулярной генетике и биотехнологии и может быть использовано для целей генотерапии в медицине, а также в сельском хозяйстве и в промышленной биотехнологии для ген-специфического сайленсинга тех генов, экспрессия которых способствует развитию тех или иных заболеваний или нарушает процесс наработки необходимого продукта.

Предложен способ изменения генетических свойств организмов путем РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу выбранного гена с помощью молекул РНК, синтезированных *in vitro*, при этом используют молекулы РНК, комплементарные в параллельном направлении (пкРНК) мРНК выбранного гена, которые синтезируют *in vivo* или *in vitro* на искусственной последовательности ДНК, имеющей зеркально-симметричную последовательность нуклеотидов по отношению к последовательности нуклеотидов гена.

Изобретением предложен общий подход к изменению генетических свойств организма, основанный на биологических свойствах зеркальных инверсий нуклеотидных последовательностей и реализующийся в РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу.

Способ изменения генетических свойств организма

Область техники

Изобретение относится к области молекулярной биологии, молекулярной
5 генетике и биотехнологии и может быть использовано для целей генотерапии в
медицине, а также в сельском хозяйстве и в промышленной биотехнологии для ген-
специфического сайленсинга тех генов, экспрессия которых способствует развитию
тех или иных заболеваний или нарушает процесс наработки необходимого продукта.

10 Уровень техники

Известны разные способы изменения генетических свойств организма. Одни
из них предполагают повреждение самого гена. К их числу относится так
называемый "нокаут" генов. Эти подходы предполагают внесение повреждений
(мутаций) в выбранном гене в клетках зародышевого пути или в стволовых клетках и
15 поэтому далеко не всегда могут использоваться для изменения свойств развившегося
организма [L.V. Varga, S. Toth, I. Novak, A. Falus, Immunol. Lett., 1999, vol. 69, p. 217;
J. Osada, N. Maeda, Methods Mol. Biol., 1998, vol.110, p. 79].

В последние годы вызывает повышенный интерес другой подход к изменению
генетических свойств организма - использование РНК-интерференции, приводящей к
20 ген-специфическому сайленсингу, при котором ген не повреждается, а изменяется
его регуляция [M.K. Montgomery, A. Fire, Trends in Genetics, 1998, vol.14, p. 255; P.
Sharp, Genes & Development, 1999, vol.13, p.139]. РНК-интерференция может
использоваться для ген-специфического сайленсинга на любых стадиях развития, в
том числе и для изменений свойств взрослого организма. Повышенное внимание к
25 исследованиям РНК-интерференции связано с тем, что они позволили случайно
обнаружить ранее неизвестные древние механизмы генной регуляции.
Физиологическая роль этих механизмов может заключаться в изменении в локальных
структурах хромосом, во влиянии на активность транскрипции, на процессинг мРНК,
ее транспорт в цитоплазму и на ее стабильность.

30 К настоящему времени РНК-интерференция, приводящая к ген-
специфическому сайленсингу, описана на различных организмах - нематоды,
дрозофиле, грибах, растениях.

Известен способ изменения генетических свойств организма, основанный на РНК-интерференции с использованием для этой цели антисмысловой РНК (асРНК), которая комплементарна в антипараллельном направлении мРНК выбранного гена, синтезируется *in vitro* и вводится в организм [A. Fire, S-Q. Xu, M.K. Montgomery, S.V. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Nature, 1998, vol. 391, p. 806].

Описанный способ осуществляют следующим образом:

1. Выбирают ген, активность которого нежелательна;
2. Готовят генетическую конструкцию, в которой данный ген или соответствующая ему кДНК
10 (последовательность, соответствующая мРНК), т.е. природная ДНК, ориентирована в противоположном направлении и находится под контролем нужного промотора. Этим обеспечивается транскрипция незначущей цепи гена. Для получения конструкций используют разнообразные векторы, которые могут содержать последовательности ДНК, важные для селекции трансформанта, для
15 эффективной экспрессии перевернутого гена и для "правильного вписывания" конструкции в хромосомные домены;
3. На полученной конструкции *in vitro* синтезируют и вводят в организм асРНК с помощью разных методов (электропорация, инъекции, *per os*).

Существенным недостатком этого способа изменения генетических свойств
20 организма с помощью РНК-интерференции является то, что при использовании конструкций, предназначенных для синтеза асРНК в результате перестроек может произойти реверсия, т.е. прекратится экспрессия асРНК и начнется синтез последовательности соответствующей цепи мРНК. Т.е. вместо подавления активности выбранного гена можно получить его активирование. Синтез цепи мРНК
25 может также начаться из-за того, что в месте инсерции конструкции могут оказаться последовательности хозяина, имеющие промоторную активность в цепи, соответствующей цепи мРНК. Вероятность таких событий высока.

Наиболее демонстративно высокая вероятность реверсий подтверждена работами с трансгенными организмами. Конструкции при этом вводились с
30 противоположной целью - добиться большей активности какого-либо гена. Однако, реверсии в результате спонтанного активирования транскрипции с противоположной цепи проводили не к увеличению активности гена, а к полному ее подавлению, т.е. к ген-специфическому сайленсингу в результате РНК-

интерференции [M.K. Montgomery, A. Fire, Trends in Genetics, 1998, vol.14, p. 255; P. Sharp, Genes & Development, 1999, vol.13, p.139].

Сущность изобретения

- 5 Предложен способ изменения генетических свойств организма путем РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу выбранного гена с помощью молекул РНК, синтезированных *in vitro*, включающий использование молекул РНК, комплементарных в параллельном направлении (пкРНК) мРНК выбранного гена, при этом пакРНК синтезируют *in vivo* или *in vitro* на искусственной
- 10 последовательности ДНК, имеющей зеркально-симметричную последовательность нуклеотидов (зеркальная инверсия) по отношению к последовательности нуклеотидов гена.

Перечень фигур

- 15 Фиг. 1 приводит данные о структуре ДНК-конструкции, содержащей зеркальную последовательность нуклеотидов относительно гена *lon* *E. coli* и предназначенной для экспрессии пакРНК, где:

- а - взаимоотношения последовательностей нуклеотидов гена *lon* и искусственной химически синтезированной последовательности ДНК, зеркально-симметричной относительно гена (+ цепи соответствуют последовательностям
- 20 пакРНК *parlon* и мРНК); синтезированная ДНК в конструкции находится под контролем промотора *lac*, обеспечивающим экспрессию пакРНК *parlon*;

б - взаимоотношения между мРНК гена *lon* и пакРНК *parlon*;

- в - гены в *lux*-регулоне: промоторы *pr* и *pl* в *lux*-регулоне работают на разных
- 25 цепях, гены показаны светлыми прямоугольниками; *Lon* белок деградирует продукт гена *R*, активирующий *pl* и, тем самым, препятствует работе генов, обеспечивающих люминесценцию.

Фиг. 2 показывает результаты люминесценции клеток *E. coli*, которая наблюдается при сайленсинге гена *lon* в результате экспрессии (*parlon*), где:

- 30 *Lux*-регулон *Vibrio fischeri* был введен в *lon*⁺ или *lon*⁻ клетки *E. coli*. В полученные *lon*⁺ клетки дополнительно порознь вводили также конструкцию, созданную на основе вектора *pUC12*, способную экспрессировать пакРНК *parlon* или исходную плазмиду *pUC12*, не содержащую вставки. Показана зависимость

интенсивности люминесценции суспензии клеток, определяемая с помощью люминометра ($\square V$), от оптической плотности (OD_{550}). Сайленсинг гена *lon* вызывает свечение трансформантов, содержащих конструкцию *parlon*.

Фиг. 3 представляет данные о структуре ДНК-конструкции, содержащей
5 зеркальную последовательность нуклеотидов относительно гена *Kruppel* дрозофилы и предназначенной для экспрессии пкРНК (*Kr-paг*), где:

а - взаимоотношения последовательностей нуклеотидов гена *Kr* и
искусственной химически синтезированной последовательности ДНК, зеркально-
симметричной относительно гена (+ цепи соответствуют последовательностям
10 пкРНК *Kr-paг* и мРНК); синтезированная ДНК в конструкции находится под контролем промотора РНК полимеразы Т7, обеспечивающим экспрессию пкРНК *Kr-paг* (синтез по другой цепи конструкции в векторе pGEM-1 обеспечивается промотором РНК полимеразы SP6);

б - взаимоотношения между мРНК гена *Kr* и пкРНК *Kr-paг*;

15 Фиг. 4 показывает фенотипы нормальной личинки дрозофилы и фенотипов *Kr*, полученных после инъекций пкРНК *Kr-paг*, где:

а - фенотипы нормальной личинки дрозофилы,

б - фенотипы личинки, развившейся из эмбрионов, инъектированных РНК *Kr-paг*, имеющих делеции торакальных сегментов, а также одного переднего
20 абдоминального сегмента,

в - фенотипы личинки, развившейся из эмбрионов, инъектированных РНК *Kr-paг*, имеющих делеции торакальных сегментов, а также трех передних абдоминальных сегментов.

Стрелка указывает атопически развившееся дыхальце, также характерное для
25 фенотипа *Kr*.

Раскрытие сущности изобретения

В основу предлагаемого изобретения положена задача повышения надежности РНК-интерференции, при которой были бы невозможны реверсии, приводящие к
30 синтезу цепи мРНК на конструкциях, исходно предназначенных для ген-специфического сайленсинга.

Предложен способ изменения генетических свойств организма путем РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу выбранного гена с

помощью молекул РНК, синтезированных *in vitro*, при этом используют молекулы РНК, комплементарные в параллельном направлении (пкРНК) мРНК выбранного гена, которые синтезируют *in vivo* или *in vitro* на искусственной последовательности ДНК, имеющей зеркально-симметричную последовательность нуклеотидов по отношению к последовательности нуклеотидов гена.

Предлагаемый способ приводит к эффективной РНК-интерференции и ген-специфическому сайленсингу и исключает синтез мРНК, т.к. в конструкциях используется негомологичная искусственная последовательность ДНК.

Предложенный способ осуществляют следующим образом:

- 10 1. Выбирают ген, активность которого нежелательна (т.е. она приводит к заболеванию или нарушает биотехнологический процесс);
2. Химически синтезируют искусственную последовательность ДНК, имеющую зеркальное чередование нуклеотидов по отношению к выбранному гену или его части;
- 15 3. Готовят генетическую конструкцию, в которой используют разнообразные векторы, содержащие синтезированную ДНК под нужным промотором и другими последовательностями, важными для эффективной экспрессии и для "правильного вписывания" конструкции в хромосомные домены;
4. Конструкцию тем или иным путем вводят в организм для синтеза пкРНК *in vivo* (трансформация), либо пкРНК синтезируют *in vitro* на конструкции и вводят в организм с помощью инъекций.
- 20

Изобретение поясняется конкретными примерами осуществления способа изменения генетических свойств организма, в которых эти изменения проявляются как изменения фенотипа, и иллюстрируется 4 фигурами.

25

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

- Приведенные далее примеры являются предпочтительными, предназначены лишь для подтверждения возможности осуществления изобретения и не должны
- 30 стать основанием для ограничения объема притязаний Заявителя. Специалист в данной области техники без труда найдет возможности иных воплощений изобретения, которые безусловно подпадают под притязания Заявителя, отраженные в формуле изобретения, приводимой ниже.

Пример 1. РНК-интерференция в клетках *Escherichia coli* с помощью молекул РНК, комплементарных в параллельном направлении мРНК гена *lon*, синтезированных *in vivo*.

Ген *lon* выбран в качестве модели, поскольку он является одним из
5 ключевых в регуляции многих процессов в клетках *E. coli*.

Химически синтезирована искусственная последовательность ДНК длиной 95
bp (bp - пара оснований в ДНК или РНК), имеющая зеркально симметричную
последовательность нуклеотидов по отношению к соответствующей области гена *lon*.

Эта ДНК использована для создания конструкции на основе вектора pUC12, в
10 которой под контролем *lac*-промотора находится цепь, экспрессирующая пкРНК
parlon (Фиг. 1 а, б).

Полученная конструкция с помощью трансформации введена в клетки *E. coli*.

За влиянием пкРНК parlon на активность эндогенного гена *lon* следят
по эффекту последнего на работу *lux*-регулона, внесенного в клетки *E. coli* из клеток
15 *Vibrio fischeri*. *Lon*-протеаза является негативным регулятором *lux*-регулона, т.к. она
специфически деградирует белок LuxR. Последний в комплексе с аутоиндуктором
запускает синтез белков, обеспечивающих люминесценцию. Промоторы *rg* и *pl* в *lux*-
регулоне работают на разных цепях, гены показаны светлыми прямоугольниками
(Фиг. 1 в). Активно работающий ген *lon* вызывает репрессию транскрипции *lux*-
20 регулона, что фенотипически проявляется в подавлении люминесценции. Напротив,
сайленсинг гена *lon* приводит к увеличению концентрации LuxR и, следовательно, к
активации транскрипции *lux*-регулона, что приводит к заметному усилению свечения
клеток. *Lux*-регулон в составе 16 kb *Bam*HI фрагмента ДНК *Vibrio fischeri*, был
25 введен в *lon*⁺ клетки *E. coli* K12 AB1157, а также в *lon*⁻ клетки *E. coli* K12 AB1899
(*lon*1).

В полученные *lon*⁺ клетки дополнительно порознь вводят также конструкцию,
созданную на основе вектора pUC12, способную экспрессировать пкРНК parlon или
исходную плазмиду pUC12, не содержащую вставки. Сайленсинг гена *lon*
определяют по возрастанию свечения клеток. Интенсивность люминесценции клеток,
30 экспрессирующих пкРНК parlon возрастает на несколько порядков по сравнению с
контролем, содержащем исходную плазмиду pUC12 (Фиг. 2).

При выращивании трансформантов parlon на твердых средах наблюдали
развитие "слизистых" колоний, что характерно для *lon*⁻ фенотипа или сайленсинга

гена *lon*.

Пример 2. Получение фенокопий *Kruppel* (Kr) при инъекциях в эмбрионы дрозофилы РНК, комплементарной мРНК в параллельном направлении, синтезированной *in vitro*.

5 Kr - гомеостический ген, активный уже в зиготе и контролирующий образование сегментов на ранней эмбриональной стадии развития дрозофилы выбран в качестве модели, позволяющей наблюдать раннее развитие в многоклеточном
10 организме. Мутанты Kr имеют делеции прилежащих торакальных и передних абдоминальных сегментов. Фенотипически это заметно сразу после развития кутикулы и выплывания личинок. Мутанты Kr имеют делеции торакальных
15 сегментов и от одного до нескольких абдоминальных сегментов, а иногда также атопически развившиеся дыхальца в передней части тела личинки [E. Weischaus, C. Nusslein-Volhard, H. Kluding, Development, 1984, vol. 104, p. 172]. Таким образом, мутанты *Kruppel* имеют уникальный фенотип, проявляющийся уже через сутки
20 развития эмбрионов дрозофилы, что удобно для изучения влияния РНК на фенотип. Дополнительным аргументом с пользой выбора данной модели было то обстоятельство, что влияние инъекций антисмысловой РНК Kr было проведено ранее [U.B. Rosenberg, A. Preiss, E. Seifert, H. Jackle, D.C. Knippe, Nature, 1985, vol. 313, p. 703].

25 Химически синтезируют искусственную последовательность ДНК длиной 160 bp, имеющую симметричную последовательность нуклеотидов по области гена Kr (Фиг. 3 а, б). Следует подчеркнуть, что антисмысловые РНК синтезируют на незначащей цепи того же самого гена, тогда как пкРНК может быть синтезирована только на гетерологичной последовательности ДНК, имеющей зеркально-симметричное чередование.

 Синтезированную ДНК используют для получения конструкции в векторе pGEM-1, позволяющим с промотора РНК полимеразы T7 вести синтез пкРНК. пкРНК была названа Kr-раг, т.к. она комплементарна мРНК гена Kr в параллельном направлении.

30 Эмбрионы линии Oregon RC инъецируют препаратами пкРНК в область плазмы заднего полюса на стадии синцития и инкубируют под водой при 25°C в течение 18-24 часов. Затем готовят препараты кутикулы и наблюдают развитие сегментов личинок под фазово-контрастным микроскопом.

Обнаружено развитие личинок имеющих характерный K_g-фенотип. В контрольных экспериментах, после инъекций РНК, синтезированной на противоположной цепи той же конструкции с помощью SP6 РНК полимеразы, наблюдают только развитие нормальных личинок.

5 Фиг. 4 представляет нормальную личинку (а), а также две личинки, полученные после инъекций препарата K_g-раг (б, в). Последние имеют делеции торакальных сегментов и одного или трех брюшных сегментов и эктопически развитое дыхальце в передней части тела личинки, что характерно для фенотипа K_g. Частота появления фенокopies K_g после инъекций РНК K_g-раг примерно
10 соответствует таковой после инъекций соответствующей асРНК [U.B. Rosenberg, A. Preiss, E. Seifert, H. Jackle, D.C. Klippe, Nature, 1985, vol. 313, p. 703]. Показано, что в многоклеточном организме, воздействуя пкРНК на экспрессию ключевого гена дифференцировки, получают направленное изменение генетических свойств организма.

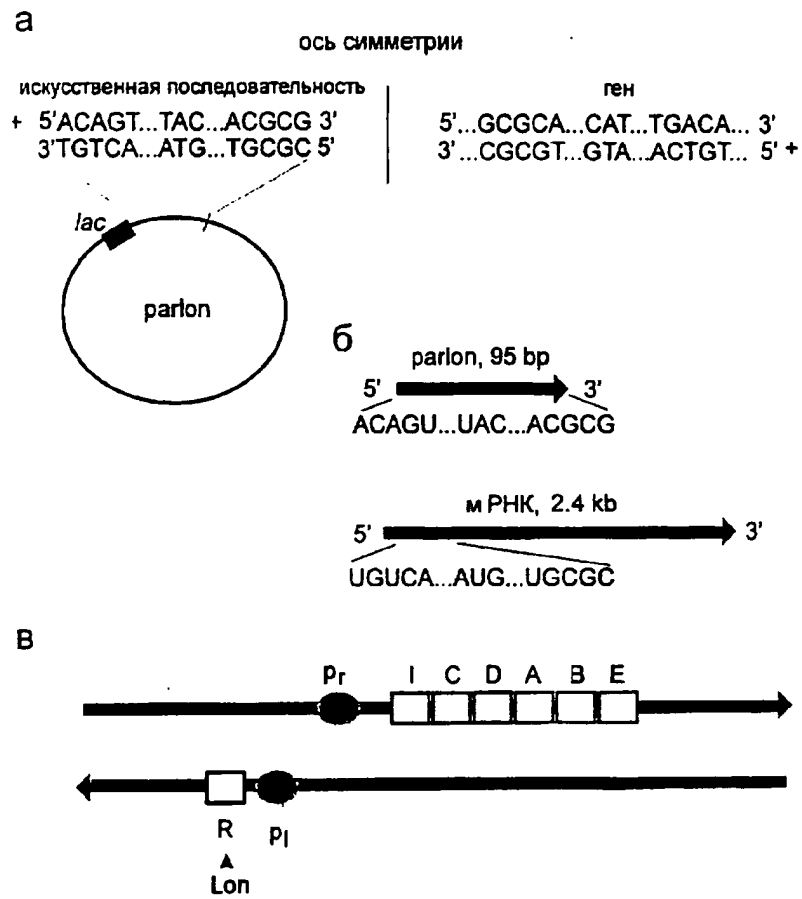
15 Таким образом, обнаружено влияние зеркальных инверсий нуклеотидных последовательностей, тем или иным путем введенных в организм, на его фенотип. Основное преимущество предлагаемого способа состоит в том, что зеркальные последовательности способны обеспечить синтез пкРНК и РНК-интерференцию, но, будучи гетерологичными последовательностями, не могут синтезировать
20 соответствующую мРНК. Поэтому при использовании этого подхода ("палиндромный подход"), в отличие от традиционного способа, использующего асРНК ("антисмысловой подход"), не может произойти реверсия и начаться синтез цепи мРНК.

Изобретением предложен общий подход к изменению генетических свойств
25 организма, основанный на биологических свойствах зеркальных инверсий нуклеотидных последовательностей и реализующийся в РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу. Предлагаемый способ, основанный на обнаруженной высокой и избирательной биологической активности транскриптов с зеркальных инверсий нуклеотидных последовательностей, приводит к изменению
30 фенотипа и может быть использован для целей генотерапии в медицине, а также в сельском хозяйстве и в промышленной биотехнологии для ген-специфического сайленсинга тех генов, экспрессия которых способствует развитию тех или иных заболеваний или нарушает процесс наработки необходимого продукта.

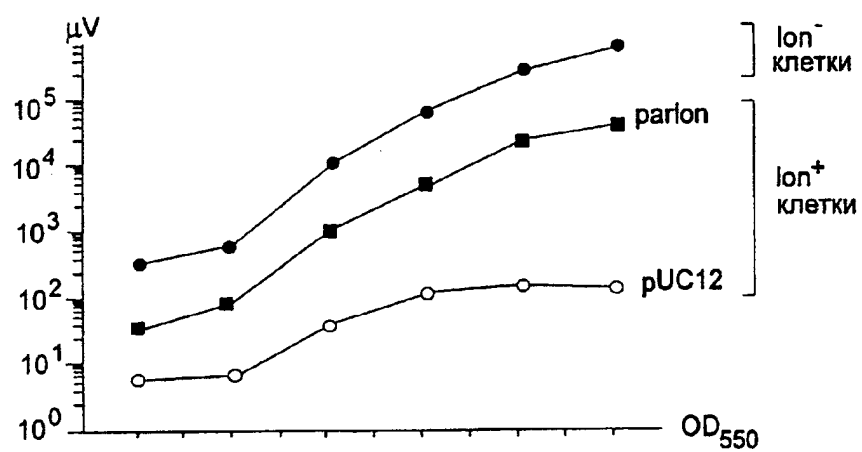
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ изменения генетических свойств организма путем РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу выбранного гена с помощью молекул РНК, синтезированных *in vitro*, отличающийся тем, что используют молекулы РНК, комплементарные в параллельном направлении (пкРНК) мРНК выбранного гена, при этом пакРНК синтезируют *in vivo* или *in vitro* на искусственной последовательности ДНК, имеющей зеркально-симметричную последовательность нуклеотидов (зеркальная инверсия) по отношению к последовательности нуклеотидов гена.

1/4

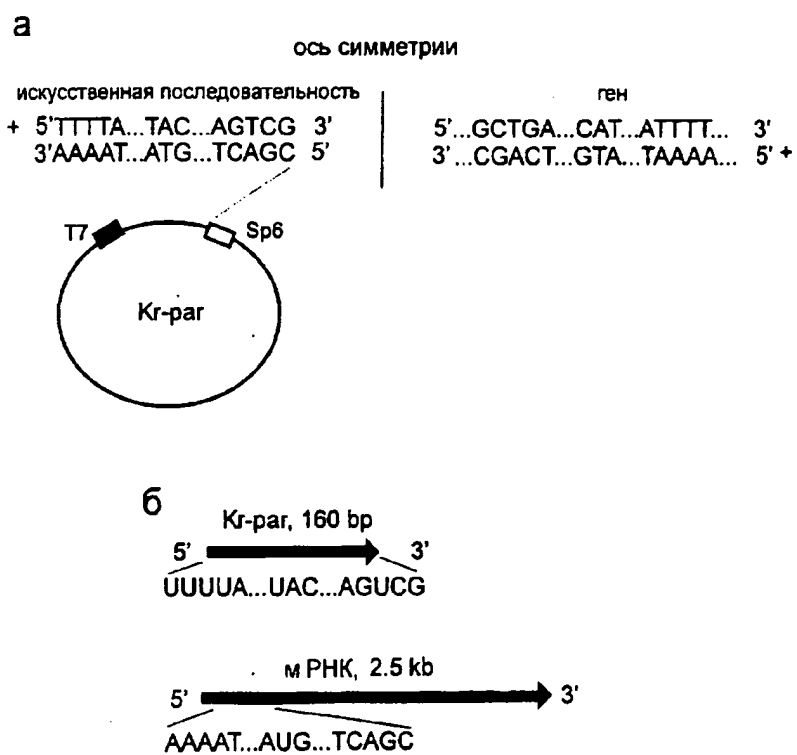


Фиг. 1



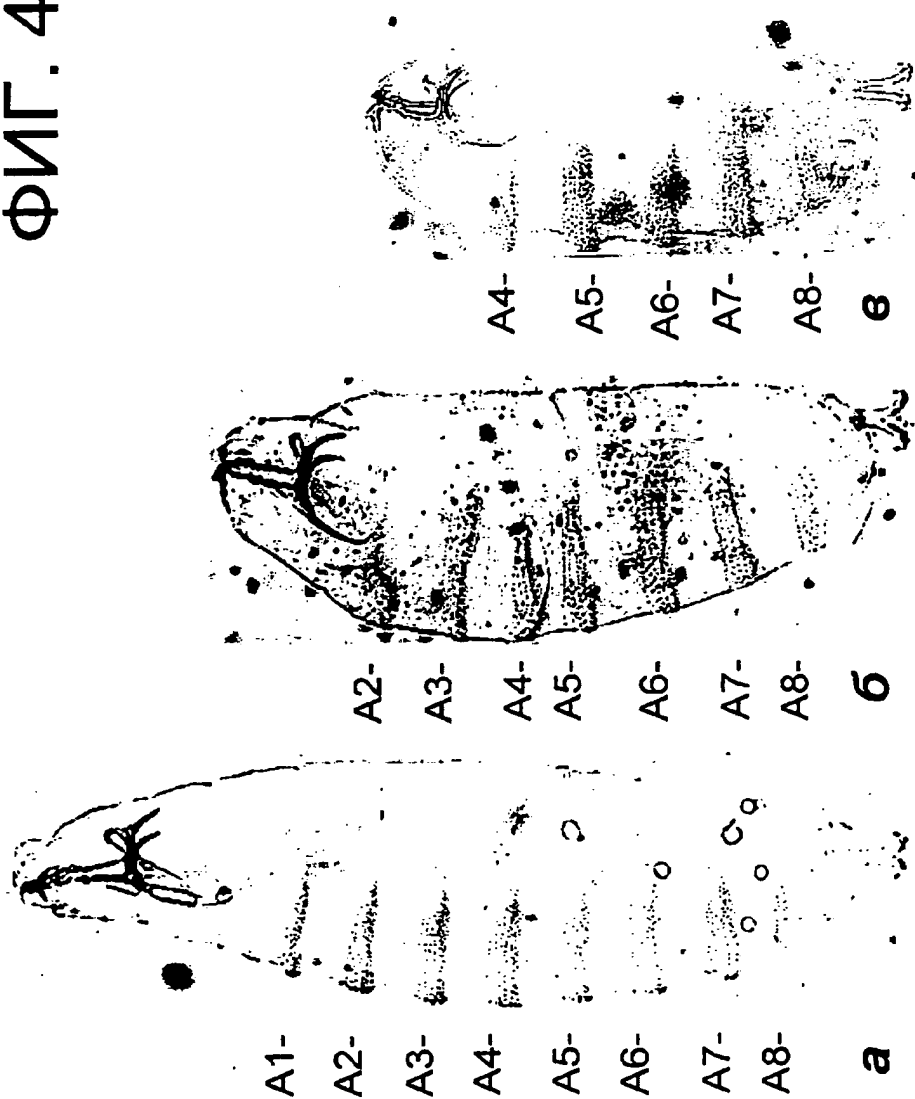
Фиг. 2

3/4



Фиг. 3

ФИГ. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 00/000504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: C12N 15/00, 15/63 // A01N 48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC B

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: C12N 15/00, 15/09, 15/10, 15/11, 15/63, A01N 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/53083 A1 (ZENECA LIMITED) 26 November 1998 (26.11.98)	1
A	RU 94046161 A1 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 10 May 1997 (10.05.97)	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 February 2001 (23.02.01)

Date of mailing of the international search report
01 March 2001 (01.03.01)

Name and mailing address of the ISA/RU

Authorised officer

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №

PCT/RU 00/00504

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12N 15/00, 15/63 // A01N 48/00

Согласно международной патентной классификации (МПК-7)

В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7:

C12N 15/00, 15/09, 15/10, 15/11, 15/63, A01N 48/00

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, поисковые термины):

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	WO 98/53083 A1 (ZENECA LIMITED) 26 November 1998	1
A	RU 94046161 A1 (ЮНИВЕРСИТИ ТЕКНОЛОДЖИС ИНТЕРНЭШНЛ ИНК.) 10.05.1997	1

☐ последующие документы указаны в продолжении графы С. ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылаемых документов:

- A документ, определяющий общий уровень техники
- E более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее
- O документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
- P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета и т.д.

- T более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для пояснения изобретения
- X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень
- Y документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории
- Z документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска: 23 февраля 2001 (23.02.2001)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 01 марта 2001 (01.03.2001)

Наименование и адрес Международного поискового органа:
Федеральный институт промышленной собственности
Россия, 121858, Москва, Бережковская наб., 30-1
Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:
О. Куликова
Телефон № (095)240-25-91

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(июль 1998)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.